

用于定性代谢流分析的 Agilent MassHunter VistaFlux

技术概述

前言

代谢组学是一种通过测量代谢物丰度了解生物系统的强大技术，但是由于缺乏动态信息，数据解析通常很复杂。例如，代谢物丰度的提高可能来源于产生量的增加（通路上调）或消耗量的减少（通路下调）。类似地，通过某一通路的代谢流的显著改变可能并不会导致代谢物中间体丰度的改变。稳定同位素示踪的巨大潜力有助于解决这些状况，还可通过提供有关代谢物相互转化的动态信息更深入地了解生物系统。定性代谢流分析突出了这些反应的相对速率。

在定性代谢流分析中，将稳定同位素标记示踪物（通常含有 ^{13}C 、 ^{15}N 或 ^2H ）引入生物系统，导致下游代谢物的天然同位素模式发生改变。在 LC/MS 分析之后，可使用来源于已知代谢物通路的目标列表挖掘数据，以对局部代谢流进行研究。测量每种目标化合物的同位素体（仅同位素组成不同的代谢物），并使用该信息追踪代谢流。

定性代谢流分析存在多项分析挑战，例如挖掘目标代谢物、解释同位素体、针对天然存在的同位素丰度进行校正，并在生物学背景下实现结果可视化。Agilent MassHunter VistaFlux 是一款专为应对这些挑战而设计的软件，是针对来源于安捷伦基于 TOF 的高分辨率液质联用系统的单纯质谱数据的定性代谢流分析解决方案（图 1）。本技术概述介绍了 MassHunter VistaFlux 在定性代谢流分析中的应用。



Agilent Technologies

创建目标代谢物列表：Pathways to PCDL 和 PCDL Manager

Agilent MassHunter Pathways to PCDL 软件（图 2）的设计有助于根据 BioCyc、KEGG 和 WikiPathways 等常见数据库中包含的通路内容中存在的代谢物创建定制安捷伦个人化合物数据库与谱库 (PCDL)。可选择多条通路以研究更复杂的生物网络。如果从主数据库（如安捷伦 METLIN PCDL）导入，定制 PCDL 中将包括来自该数据库的所有化合物信息（保留时间、MS/MS 谱图、化合物标识符和结构）。

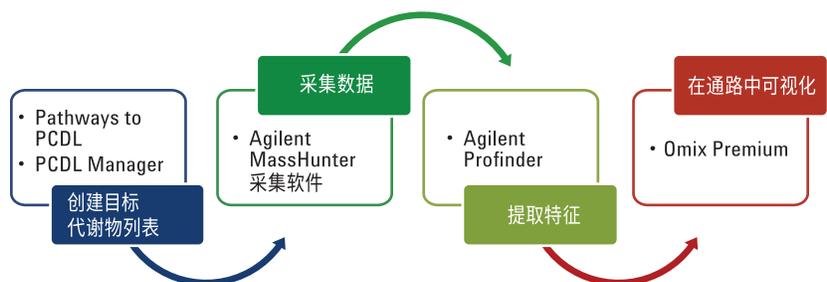


图 1. Agilent MassHunter VistaFlux 解决方案

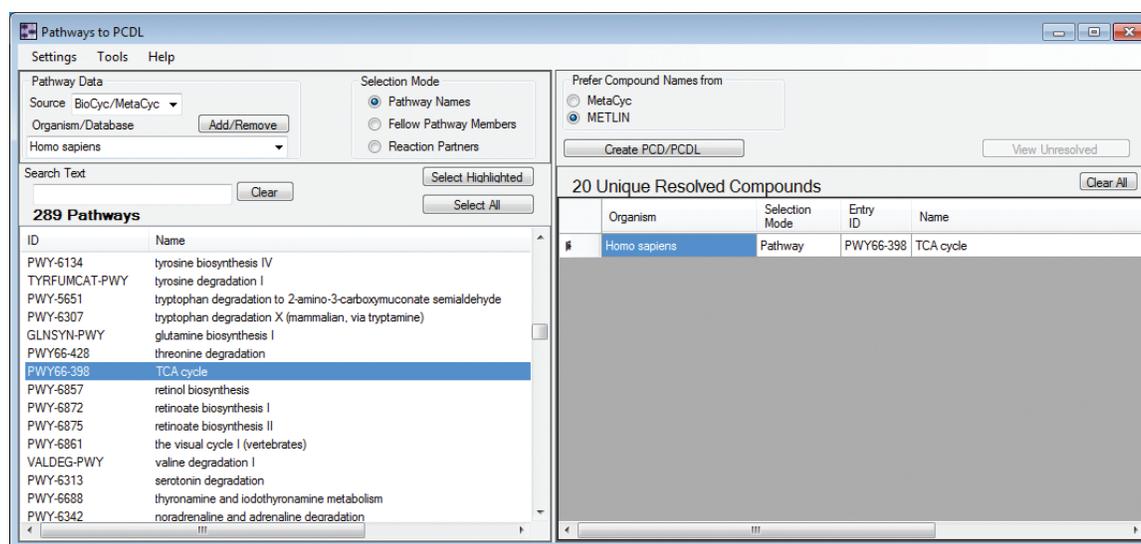


图 2. 在 Agilent MassHunter Pathways to PCDL 中创建基于通路的目标代谢物列表

所得的 PCDL 可在 Agilent MassHunter PCDL Manager 中进行查看和编辑 (图 3)。例如, 可删除未检出的或与实验无关的代谢物, 还可向 PCDL 中添加额外的化合物。对于目标同位素分析, 必须从主数据库中导入保留时间, 或添加所有目标代谢物的保留时间。然后这一定制 PCDL 可用于指导通过 Agilent MassHunter Profinder 软件对 LC/MS 数据中的同位素体进行目标挖掘。

采集数据: Agilent MassHunter 采集软件

目标数据分析采用保留时间来鉴定代谢物, 因此稳定的液相色谱分析方法对于批处理至关重要。除分离同分异构代谢物以外, 对同位素体可能叠加的代谢物实现充分的色谱分离同样非常重要。干扰同位素会影响同位素体提取以及同位素体掺入结果准确度。可使用更慢的梯度、更长的色谱柱和更小粒径的固定相改善色谱分离。

MassHunter Profinder 可处理棒状数据或轮廓数据, 但是后者可提供更出色的结果, 因为先进的算法特征能够利用轮廓谱图中提供的额外信息内容。安捷伦 TOF 系统的内部参比质量功能对于确保大量样品的质量准确度非常重要, 该功能使 Profinder 能够准确区分代谢物同位素体与质量数相似的共洗脱化合物。由于代谢物中稳定同位素的掺入速率不同, 因此可能需要提高分析的样品量以充分检测所有目标同位素体。

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS	ChemSpider	METLIN	HMP	KEGG	LMP	IUPAC Name
L-Glutamate	C5H9NO4	147.05316	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2.260	56-86-0		19	HMDB00148	C00026		
L-Aspartic Acid	C4H7NO4	133.03751	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2.290	56-84-8		15	HMDB00191	C00049		
L-Lactic acid	C3H6O3	90.03169	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2.930			45858		C00186	LMFA01050410	
Glutathione, oxidized	C20H32N6O12S2	612.15196	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4.840	27025-41-8		45		C00127		
Succinic acid	C4H6O4	118.02661	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.050	110-15-6		114	HMDB00254	C00042	LMFA01170043	
2-Hydroxyglutarate	C5H8O5	148.03717	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.110	2889-31-8		63268		C02630		
Fumaric acid	C4H4O4	116.01096	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.130	110-17-8		3242	HMDB00134	C00122		
L-Malic acid	C4H6O5	134.02152	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.130			45931	HMDB00156	C00149		
Oxoglutaric acid	C5H6O5	146.02152	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.240	328-50-7		119	HMDB00208	C00026		
5' guanylate diphosphate (guanosine diphosphate)	C10H15N5O11P2	443.02433	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.830	146-91-8		99	HMDB01201	C00035		
ADP	C10H15N5O10P2	427.02942	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5.930	58-64-0		34522	HMDB01341	C00008		
Aconitic acid	C6H6O6	174.01644	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	6.100	499-12-7		3300	HMDB00072	C00417		

图 3. PCDL Manager 中显示的目标代谢物列表

提取目标代谢物的同位素体：

MassHunter Profinder

MassHunter Profinder 是一款针对质谱数据的快速批处理软件，具有代谢物同位素体掺入的质量审查和可视化功能。由于不同目标化合物中稳定同位素的掺入速率不同，预计检出的同位素体分布随时间而改变，因此通常有必要开展时序研究。MassHunter Profinder 的设计旨在简化此类研究的分析

和审查。它提供了重复数据文件的分组、化合物比对、多色谱图叠加、按样品组着色、色谱峰手动重新积分和结果导出。

MassHunter Profinder 中的批处理同位素体提取算法¹ 使用目标代谢物列表 (.CDB)，基于代谢物化学式提取所有可能的同位素体。提取的关键用户设置包括选择稳定同位素标记类型、标记纯度、质量容差和保留时间容差。

提取完成后，MassHunter Profinder 将显示每种代谢物的化合物汇总表、化合物提取离子色谱图、化合物质谱图以及批次中每个 LC/MS 文件的同位素体信息 (图 4)。在 MassHunter Profinder 中，可根据天然同位素丰度校正同位素体信息，也可将该信息显示为绝对丰度或相对丰度。

在批处理后，MassHunter Profinder 可将批处理结果 (.PFA 格式) 导出到 Omix Premium，以实现通路可视化和生物解析。

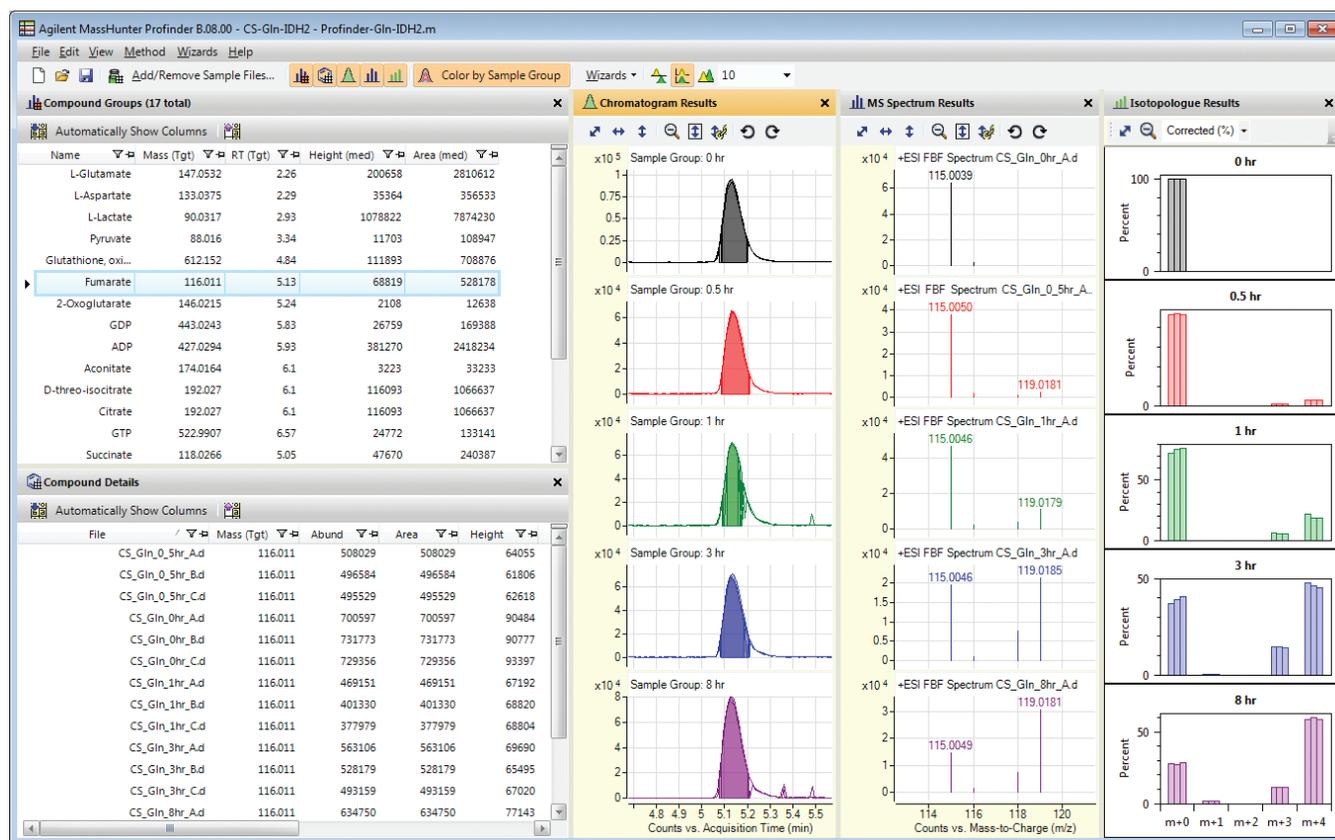


图 4. 针对 TCA 循环 ¹³C 标记时序研究的 Agilent MassHunter Profinder 结果汇总

在通路中实现同位素体结果 可视化: Omix Premium

Omix Premium 设计旨在无缝导入 MassHunter Profinder 结果, .PFA 批量导出格式包含的所有信息可供 Omix Premium 在通路图上轻松实现代谢流数据的可视化。其中包括样品组信息、化合物标识符和同位素体丰

度 (图 5)。Omix Premium 可从 BioCyc 和 KEGG 等常见数据库导入通路, 也可手动创建通路。可添加并连接多条通路, 用户也可对通路进行修改。Omix Premium 中的通路源必须匹配目标代谢物 PCDL 中所用的标识符信息, 以便准确映射 MassHunter Profinder 结果。

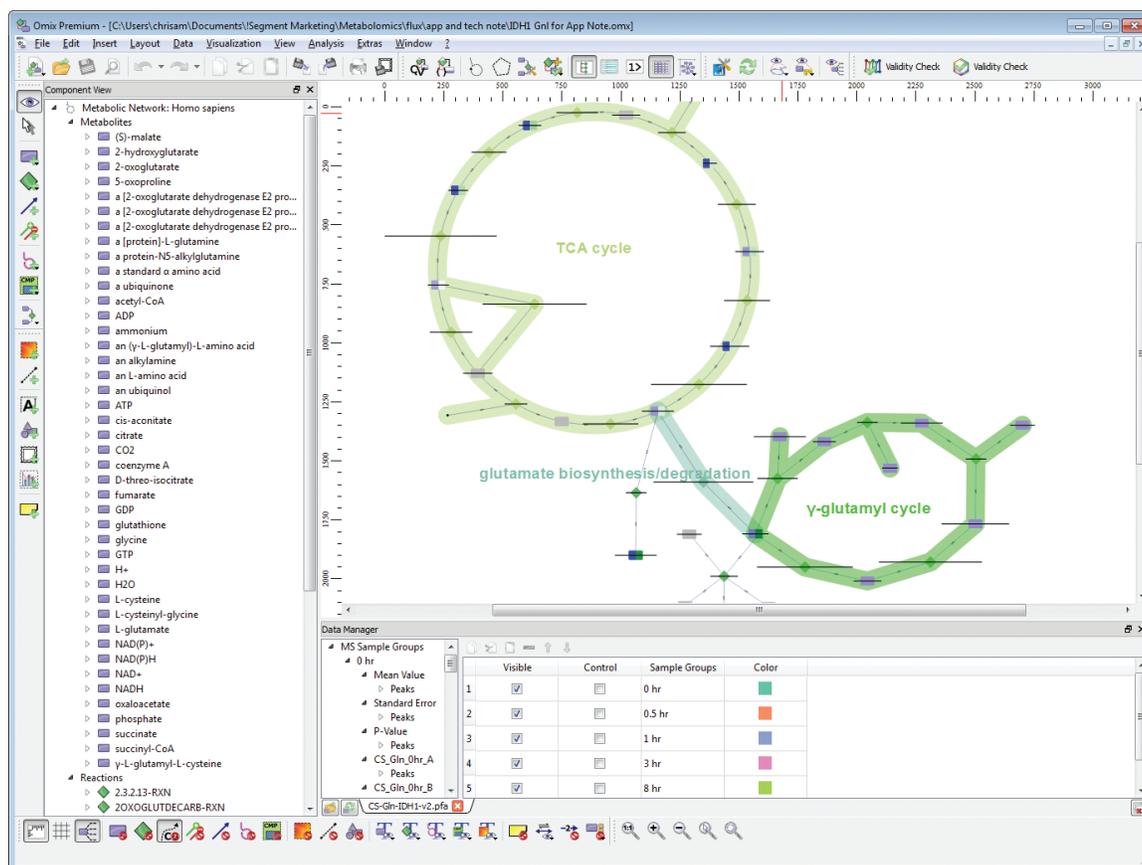


图 5. Agilent MassHunter Profinder 结果的 Omix Premium 视图, 显示包括在 .PFA 批处理结果文件导入中的样品组信息

Omix Premium 使用户能够选择在通路图上显示不同信息，从而调整可视化结果。例如，图 6A 和 6B 显示了 TCA 循环中延胡索酸节点的若干结果可视化选项。在图 6A 中，热点图在 y 轴上显示时间点结果，在 x 轴上显示同位素体，相对丰度以填充颜色强度显示，统计显著性以框中的符号表示（· 和 * 分别为 $p < 0.005$ 和 $p < 0.05$ ）。将延胡索酸节点分左右涂色，左侧总结了总体代谢物丰度，右侧颜色梯度表示稳定标记掺入百分比。图 6B 显示了相同结果，其中将延胡索酸框着色以指示代谢物相对于其他检出代谢物的丰度。采用同位素体柱图表示这一特定实验中采集的不同时间点。误差

线指示重复测量中得到的标准偏差。该图类似于 MassHunter Profinder 中的同位素体图示，并且为估计同位素掺入的百分比提供了更出色的视图。两种作图方式都清晰地表明，在 M+4 同位素体随时间推移越来越多地被 ^{13}C 示踪物标记时，M+0 同位素体随之逐渐减少。

ATP 和 ADP 等一些代谢物普遍存在，并未被稳定同位素示踪物标记，但所测量的丰度代表总细胞浓度，仍为整个实验的解析提供了有用信息。这些化合物的代谢物节点可包括在内，或与具有相同标注和数据可视化选项的特定通路分开显示。

时序研究对于捕获代谢的流动性非常重要。Omix Premium 提供了静态和动态可视化功能，使时序结果更易于解析（图 7）。这些动画中包括将同位素掺入显示为节点填充的选项，可轻松录制并生成电影文件。

提供静态和动画通路可视化功能，使实验结果易于解析和说明。Omix Premium 可视化结果可导出为图片，以便发表、演示或报告。

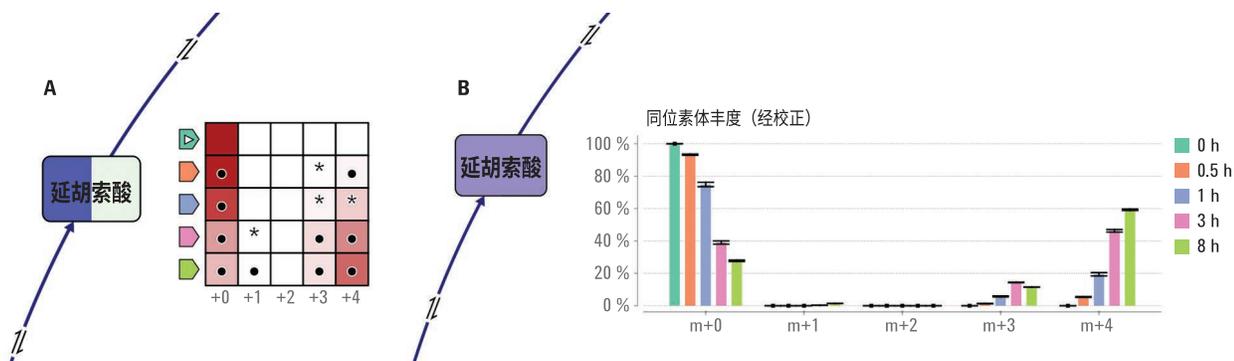


图 6. A) 显示了延胡索酸同位素体丰度的热点图。B) 显示了经校正的相对同位素体图，提供了更详细的结果信息

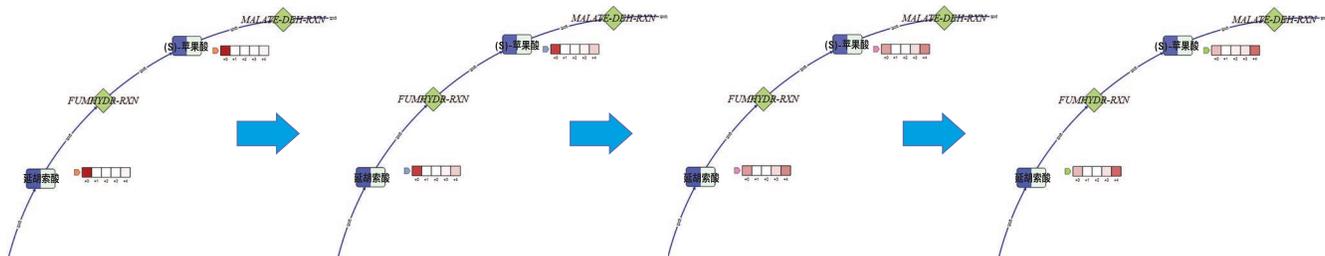


图 7. 时序研究中代谢流的逐步视图，分别表示 0.5、1、3 和 8 小时时间点（从左到右）的延胡索酸和苹果酸

结论

Agilent MassHunter VistaFlux 能够通过降低数据处理的难度来实现目标定性代谢流分析。之前涉及电子表格中繁琐的数据解析和手动计算的实验，现在通过采用高效的常规工作流程对大量样品进行批处理可以轻松实现。VistaFlux 结合了目标代谢物列表的轻松创建、先进的同位素体提取算法以及灵活的通路可视化工具。VistaFlux 通过采集代谢的流动性以及增加生物学理解扩展了代谢组学研究。

参考文献

1. MassHunter Profinder：应对定性代谢流分析中同位素体提取的挑战，安捷伦科技公司，出版号 5991-6817CHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2016

2016年4月8日，中国出版

5991-6756CHCN



Agilent Technologies